

Dynabeads FlowComp Flexi 日本語マニュアル

注：詳細は英文の商品添付文書でご確認ください

商品構成

Dyanbeads FlowComp Flexi は Part A (Dynabeads FlowComp) と Part B (DSB-X Biotin Protein Labeling Kit) の 2 箱から構成されています。

- Part A
 - FlowComp™ Dynabeads (15 mg/ml) 3 ml
 - FlowComp™ Release Buffer 2 x 20 ml
- Part B
 - DSB-X. biotin, succinimidyl ester (Component A), 5 vials of 200 µg each
 - Dimethylsulfoxide (DMSO), anhydrous (Component B), 500 µL
 - Reaction tubes (Component C), five 2 mL tubes, each containing a stir bar
 - Purification resin (Component D), 10 mL of sedimented resin with a size exclusion of ~30,000 MW
 - Spin columns (Component E), five
 - Collection tubes (Component F), five
 - Dialysis tubing (Component G), five pieces, each with a size exclusion of ~12,000.14,000 MW

その他必要な器具試薬

- Isolation buffer: Ca²⁺, Mg²⁺ free PBS with 0.1% BSA, 2mM EDTA pH7.4
- tiltingとrotationが同時に可能なミキサー
- マグネット：MPC-L, MPC-15, MPC-50 (MPC-1は使用不可)
- フローサイトメトリー用抗体
- PBS pH7.2
- 1M sodium bicarbonate

DSB-X Biotin Protein Labeling kit による抗体の DSB-X Biotin 標識

・抗体の調整

- 🌈 DSB-X Biotin により標識する抗体は精製されているものをご用意ください
- 🌈 抗体の濃度は 0.5-3mg/mL であればそのままご使用いただけます。
- 🌈 抗体が希釈されている Buffer 中に 1 級アミン (Tris, glycine など) やアンモニウムイオンが含まれる場合、付属のカラムなどを用いて脱塩する必要がある場合がございます。
- 🌈 低濃度のアジ化ナトリウム (<3mM) やチメロサル (<1mM) は反応に影響いたしません

・抗体のラベリング

抗体のラベリングは反応させたい容量によって以下に記載している 2 通りの方法がございます。

1. 小容量 (0.2mL) のラベリング反応

1.1 200 µL の抗体溶液 (0.5-3mg/mL) を 2mL の Reaction tubes (Component C)に移します。20 µL の 1M

sodium bicarbonate 溶液（用事調整）を加えます。

1.2 40 μ L の DMSO(Component B)を 1 バイアルの DSB-X. biotin, succinimidyl ester (Component A)に加え、ピペティングで完全に溶解させます。

*反応性の低下を防ぐため DMSO による溶解は使用の直前に行ってください。

1.3 表 1 に従って添加する DSB-X Biotin 溶液の量を決定します。

| 抗体溶液の濃度 (mg/mL) | 抗体溶液の容量(mL) | 使用する DSB-X Biotin 溶液量(μ L) |
|-----------------|-------------|---------------------------------|
| 0.5 | 0.2 | 2 |
| 1.0 | 0.2 | 3 |
| 1.5 | 0.2 | 4 |
| 2.0 | 0.2 | 5 |
| 2.5 | 0.2 | 6 |
| 3.0 | 0.2 | 7 |

1.4 Reaction tube 内の抗体溶液に適量の DSB-X Biotin 溶液を加えよく混ぜます。

1.5 室温で 1-1.5 時間攪拌します。

1.6 Spin columns (Component E)を 13x100 mm のガラスチューブにセットします。

1.7 Purification resin (Component D)を攪拌した後、溶液 1mL をカラムに添加し、resin を充填します。

1.8 さらに懸濁した Purification resin を添加し、最終容量が 1.5 mL 以下になるように充填します。自然落下により、column buffer をカラムから流し出して下さい。Column buffer を流し出すために、最初に圧力をかけなければならない場合があります。Column buffer は collection tube に回収せず、廃棄して下さい。

1.9 Spin column を collection tube(Component F)へ移し、スイングローターにより、1100 \times g で 3 分間遠心を行って下さい。遠心後、collection tube 内の buffer は、廃棄して下さい。以上の操作で、カラムの準備は終了です。なお、回転数(rpm)と遠心重力(g)の計算については、以下の数式を用いて算出して下さい。

$$\text{Relative centrifugal force} = (1.12 \times 10^{-5}) (\text{rpm})^2 (\text{radius})$$

1.10 反応後の抗体溶液(-200 μ L)をカラムに添加し、充填したカラムに浸透させてください。反応中に析出物などがみられた場合は遠心を行い、上清のみをカラムに添加して下さい。

1.11 Spin column を空の collection tube へ移し、1100 \times g で 5 分間遠心を行って下さい。

1.12 遠心後、collection tube には、ラベルされた抗体が、およそ 200 μ L PBS(pH 7.2, 2mM sodium azide)とともに回収される。ラベルに用いられなかったフリーの DSB-X biotin は、カラム中に残ります。

1.13 ラベルされた抗体の回収率は、およそ 80-90%になります。ラベルされたおよその抗体濃度は、以下の式により算出できます。

$$\text{mg/mL DSB-X biotin-labeled protein} = \frac{\text{initial mg of protein} \times 0.85}{\text{mL in collection tube}}$$

2. 大容量 (1mL) のラベリング反応

2.1 0.5-3mg/mL の抗体溶液 1.0mL を stir bar と一緒に reaction tube(Component C)へ移し、100 μ L の 1M sodium bicarbonate 溶液 (用事調整) を加えます。

2.2 40 μ L の DMSO(Component B)を 1 バイアルの DSB-X. biotin, succinimidyl ester (Component A)に加え、ピペティングで完全に溶解させます。

*反応性の低下を防ぐため DMSO による溶解は使用の直前に行ってください。

2.3 表 2 に従って添加する DSB-X Biotin 溶液の量を決定します。

| 抗体溶液の濃度 (mg/mL) | 抗体溶液の容量(mL) | 使用する DSB-X Biotin 溶液量(μ L) |
|-----------------|-------------|---------------------------------|
| 0.5 | 1.0 | 9 |
| 1.0 | 1.0 | 12 |
| 1.5 | 1.0 | 16 |
| 2.0 | 1.0 | 22 |
| 2.5 | 1.0 | 26 |
| 3.0 | 1.0 | 30 |

2.4 攪拌しながら、Reaction tube 内の抗体溶液に適量の DSB-X Biotin 溶液を加えよく混ぜます。

2.5 室温で 1-1.5 時間攪拌します。

2.6 Dialysis tubing (Component G)を 1 つ準備し、蒸留水で洗浄して下さい。Dialysis tubing の一方の端を結び、不要な蒸留水を絞り出し、抗体反応液を全量 dialysis tubing へ移し、dialysis tubing のもう一方の端を抗体溶液が漏れ出さないようにしっかりと結んで下さい。

2.7 1L のビーカーに PBS または適切な buffer を入れ、ゆっくりと攪拌しながら dialysis tubing を溶液内に吊るして下さい。透析反応は、2-8 、24 時間行って下さい。なお、反応中 3-4 回 buffer を交換して下さい

2.8 1 mg/mL の IgG 溶液の 280nm の吸光度は、1cm 幅のキュベットで 1.3-1.4 になります。このことから、DSB-X biotin ラベルされた抗体濃度は、280nm の吸光度より算出して下さい。

Dynabeads FlowComp Flexi による細胞の分離

- DSB-X ラベルされた抗体により細胞を分離します。
- 1×10^8 cells/mL の細胞 Isolation Buffer 懸濁液を準備して下さい。
- 5×10^7 の細胞に対して約 10ml の cold Isolation Buffer を準備します。

🌟 メーカー推奨の細胞調整方法は以下のページでご確認ください

(<http://www.invitrogen.com/content.cfm?pageid=11199>)

分離操作 (本プロトコルは 5×10^7 cells からの分離用ですので細胞数に応じてスケールアップして下さい)

1. 5×10^7 cells を 500 μ l の Isolation Buffer で懸濁し、25 μ l の DSB-X ラベルされた抗体を加えます。
2. よく混和し 2-8 で 10 分間インキュベートします。
3. 2mL の cold Isolation Buffer を加えた後、350 x g で 8 分間遠心分離します。
4. 上清を静かに取り除きます。
5. 1mL の cold Isolation Buffer で再懸濁します
6. 75 μ l の再懸濁した FlowComp Dynabeads を加えてよく混和します

7. 2-8 で 15 分間インキュベートします (ローテーターを必ず使用してください)
8. 磁石にチューブを 1 分間セットします。
9. 上清を静かに除去します。
10. チューブをマグネットからはずした後、1ml の cold Isolation Buffer で再懸濁し、穏やかに 5 回ピペティングします。
11. 磁石にチューブを 1 分間セットします。
12. 上清を除去します。
13. 1ml の FlowComp™ Release Buffer で再懸濁します。
14. 室温で 10 分間混合しながらインキュベートします。(ローテーターを必ず使用してください)
15. 穏やかに 5 回ピペティングし細胞をミックスした後、チューブをマグネットに 1 分間セットします。
16. ビーズフリーの細胞を含む上清を新しいチューブに移し、このチューブを再びマグネットに 1 分間セットします (ビーズを完全に除去します)。
17. ビーズフリーの細胞を含む上清を別の新しいチューブに移し、2ml の Isolation Buffer を加え、350 x g で 8 分間遠心分離します。
18. 上清を取り除き、お好みのメディウムで再懸濁してください。細胞はダウンストリームアプリケーションに使用するまで 2-8 で保存します。

補足情報

・トラブルシューティング

- ✚ ガンマグロブリンや Fc ブロッキング試薬を使用することを推奨することで細胞の凝集を防ぐことができます
- ✚ 洗浄のステップを繰り返したり、FlowComp Release Buffer を加える前に新しいチューブに移すなどの操作で純度を上げることが可能です。
- ✚ Dynabeads とのインキュベーションには必ずミキサーを使用してください
- ✚ MPC-1 マグネットは磁力が十分でないため使用しないでください
- ✚ 推奨よりも少ない量で Dynabeads を使用しないでください
- ✚ ピペティング容量とインキュベーション時間は正確に行ってください
- ✚ ピペティング時に泡ができないよう注意してください
- ✚ 染色抗体は一次抗体を使用し、蛍光標識二次抗体を使用しないでください

・ Isolation Buffer

- ✚ 推奨の Isolation Buffer の代わりに PBS with 2% FCS, 1mM EDTA でも使用可能です

株式会社ベリタス
〒105-0013 東京都港区浜松町1丁目10-14
住友東新橋ビル3号館5階
TEL: 03-5776-0078 03-5776-0040 (技術サポート直通)
FAX: 03-5776-0076
E-mail techservice@veritastk.co.jp